

Vera Lúcia Meireles Carpinteiro Ribeiro

Estudo de compostos bioativos presentes em *Adansonia digitata* e o seu potencial fitoquímico
na indústria farmacêutica.

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Vera Lúcia Meireles Carpinteiro Ribeiro

Estudo de compostos bioativos presentes em *Adansonia digitata* e o seu potencial fitoquímico
na indústria farmacêutica



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2012

Vera Lúcia Meireles Carpinteiro Ribeiro

Estudo de compostos bioativos presentes em *Adansonia digitata* e o seu potencial fitoquímico
na indústria farmacêutica

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Agradecimentos

À Prof. Doutora Ana Vinha, pela sua disponibilidade, apoio e dedicação a este trabalho.

À minha Família e Amigos por todo o amor, força, encorajamento e paciência que sempre tiveram para me dar.

Resumo

O género *Adansonia digitata*, comumente conhecido como baobab compreende oito espécies das quais seis são endémicas da ilha de Madagáscar (*A. fony*, *A. za*, *A. madagascariensis*, *A. suarezensis* e *A. perrieri*), uma de África (*A. digitata*) e uma da Austrália (*A. gregorii*). Entre as espécies supracitadas, a que tem merecido particular atenção é a *A. digitata* possivelmente devido à sua frequente utilização na medicina tradicional.

O stresse oxidativo produzido no organismo relaciona-se com o aparecimento e/ou desenvolvimento de uma série de doenças crónicas não transmissíveis. Os compostos bioativos, presentes nos frutos, são capazes de neutralizar as estruturas radicalares formadas no metabolismo humano, diminuindo o risco do aparecimento de doenças crónicas, nomeadamente do foro cardiovascular e carcinogénico.

As frutas são caracterizadas como fontes naturais de energia, hidratos de carbono, vitaminas e minerais, bem como, pelo seu contributo na aquisição de compostos bioativos que apresentam benefícios para a promoção da saúde em geral. A dietoterapia e a fitoterapia são duas vias terapêuticas de recurso natural em franca ascensão, relacionando o conceito de alimentos funcionais com a ação farmacológica uma vez que a ação antioxidante dos compostos bioativos depende, não só, das suas estruturas químicas como também das suas concentrações. Atualmente, o recurso e o interesse no conhecimento da composição nutricional e fitoquímica dos frutos exóticos têm aumentado, não só pelo fácil acesso a estes recursos naturais como pelo interesse económico que os mesmos podem potenciar a economia nacional dos países em desenvolvimento.

O presente trabalho teve como objetivo a análise quantitativa dos compostos bioativos mais representativos da polpa do fruto da árvore *Adansonia digitata*, de Angola, cidade de Benguela, local de onde são provenientes os frutos estudados. Foi avaliada a atividade antioxidante pelo método espectralométrico do radical livre DPPH•.

Os resultados obtidos mostram que o fruto do baobab angolano possui teores elevados de vitamina C e de fenólicos totais, o que explica a sua elevada capacidade antioxidante. Os teores de carotenóides apresentaram teores pouco significativos para a matriz estudada, uma vez que a coloração da polpa do fruto carece de pigmentação.

Este estudo, embora preliminar, indicou por meio de uma abordagem fitoquímica *in vitro*, a presença de compostos com propriedades bioativas, visando o seu interesse para a sua aplicação numa vertente tanto alimentar como farmacêutica para a elaboração de suplementos naturais com atividade farmacológica e terapêutica.

Palavras-Chave: *Adansonia digitata*; Fenólicos totais; Carotenóides; Ácido ascórbico; Atividade antioxidante (DPPH•).

Abstract

The *Adansonia digitata* genus, commonly known as baobab comprises eight species, which six are endemic from Madagascar island (*A. fony*, *A. za*, *A. madagascariensis*, *A. suarezensis* and *A. perrieri*), one of Africa (*A. digitata*) and one from Australian (*A. gregorii*). Among the above species, the one who has received particular attention is the *A. digitata*, possibly due to its frequent use in traditional medicine.

The oxidative stress produced in live organisms is related to the appearance and/or development of a series of non-transmissible chronic diseases. Phenolic compounds present in fruits are able to neutralize these substances, thus reducing the risk of development of free radicals associated to several pathologies, such as cardiovascular disease and cancer.

Fruits are characterized as natural sources of energy, carbohydrates, vitamins and minerals as well as for their contribution in the contribution of bioactive compounds that exhibit high benefits for the health promotion.

The dietotherapy and the phytotherapy are two therapeutic natural resources in great ascension, relating the concept of functional foods with the pharmacological action. The antioxidant activity of bioactive compounds depends, not only on their chemical structures as well as their concentrations in fruits. Currently, the knowledge and the interest in the nutritional and phytochemical composition of exotic fruits have been increasing, not only because of their easy access to the natural resources as the economic interest that they can boost the national economy of developing countries.

The aimed of the present study was to evaluate the characterization of bioactive compounds more representative of the fruit pulp of *Adansonia digitata* tree, from Angola, more exactly from Benguela city place where fruits studied come from. Results showed that the Angolan baobab fruit has high levels of vitamin C and phenolic compounds, which explains its high antioxidant capacity. The carotenoids content were underrepresented in this studied, what was expected, once the fruit pulp lacks of pigmentation.

This study, although considered as a preliminary and incomplete work indicated an *in vitro* phytochemical approach and the presence of compounds with bioactive properties, aiming the interest for its application, not only in the food diet as well as a natural resource for pharmaceutical industry, particularly in developing natural supplements with therapeutic and pharmacological activities.

Keywords: *Adansonia digitata*; Total of phenolics; Carotenoids; Ascorbic acid; Antioxidant activity (DPPH[•]).

Índice Geral

	Págs.
Capítulo I. Introdução	1
Capítulo II. Objetivo	4
Capítulo III. Revisão Bibliográfica	5
3.1. A árvore (<i>Adansonia digitata</i> L.)	5
3.2. O fruto	6
3.3. Principais aplicações do fruto Baobab	7
3.4. Benefícios do fruto	9
3.5. Compostos de importância funcional	10
3.5.1. Ácido ascórbico	11
3.5.2. Compostos fenólicos	12
3.5.3. Carotenóides	15
3.6. Atividade antioxidante	16
3.6.1. Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	18
3.6.1.1. Método do radical livre DPPH [•]	19
Capítulo IV. Materiais e Métodos	20
4.1. Material	20
4.2. Reagentes	20
4.3. Determinação dos compostos antioxidantes	21
4.3.1. Ácido ascórbico	21
4.3.2. Quantificação dos fenólicos totais	21
4.3.3. Quantificação do teor dos carotenóides totais	22
4.3.4. Método radical DPPH [•]	22

Capítulo V. Resultados e Discussão	24
Capítulo VI. Conclusão	30
Capítulo VII. Bibliografia	32

Índice de Tabelas

	Págs.
Tabela 1 – Comparação dos teores de vitamina C de algumas frutas	12
Tabela 2 – Teores de ácido ascórbico na polpa do baobab angolano estudado	25
Tabela 3 – Compostos fenólicos totais, carotenóides totais e atividade antioxidante presente da polpa do fruto estudado	26

Índice de Figuras

	Págs.
Figura 1 – <i>Adansonia digitata</i> L.	5
Figura 2 – Polpa do fruto de <i>Adansonia digitata</i> L.	7
Figura 3 – Fórmula química do ácido ascórbico	11
Figura 4 – Estrutura química dos flavonoides	14
Figura 5 – Fruto de <i>Adansonia digitata</i> L.	20

Abreviaturas

AA – ácido ascórbico

ADHA – ácido desidroascórbico

BHT – 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol

DIP – 2,6-diclorofenol

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPPH[•] – 2,2 –difeníl–1–picríl–hidrazila

g - grama

GA – ácido gálico

GAE – equivalentes ácido gálico

L – litro

mg – miligrama

mL – mililitro

nm - nanómetro

Capítulo I. Introdução

Os ecossistemas humanos, incluindo as comunidades construídas, são subconjuntos de um ecossistema maior que é o planeta Terra. A sustentabilidade é um processo que tenta conciliar as necessidades reais e os desejos do Homem. O conhecimento sobre a sustentabilidade e o futuro da humanidade depende, em grande parte, da compreensão do passado.

Prevê-se que até 2050, as necessidades alimentares mundiais venham a aumentar significativamente, devido não só ao aumento da população mas também devido à melhor e maior ingestão alimentar. Para além da necessidade de tornar a agricultura mais produtiva, é necessário torná-la mais sustentável. Atualmente, o progresso tem sido retardado pela falta de conhecimento e compreensão de como ultrapassar o problema da sustentabilidade e, consequentemente, estudar e promover conhecimentos científicos sobre alimentos típicos de uma cultura que possam beneficiar a saúde mundial (Spiertz, 2010).

O recurso às plantas medicinais é uma prática antiga descrita como medicina botânica ou fitoterapia (Evans, 2002). A crescente sofisticação do estilo de vida entre as populações do mundo tornou imperativo o recurso às plantas naturais como medicina alternativa ou complementar, independentemente da filiação cultural. Esse tipo de prática apesar de não ser reconhecida é descrito como medicina tradicional indígena ou folclórica. Segundo Sumner (2000) dois terços da população mundial têm recorrido a métodos terapêuticos baseados na medicina tradicional. A medicina tradicional tem uma representação considerável no continente Africano, muitas vezes atribuída à herança sociocultural e socioeconómica da população desse continente. Na realidade, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (Maciel e Veiga Jr., 2002). A atividade terapêutica das plantas usadas na medicina tradicional pelos “curandeiros tradicionais” apoia-se numa visão holística do tratamento em si. As substâncias presentes nas plantas medicinais com propriedades preventivas e/ou curativas são conhecidas como princípios ativos (Adebanjo *et al.*, 1983; Kitula, 2007; Sidhu e Pannu, 2010), que diferem qualitativa e quantitativamente de planta para planta, e dos quais se

destacam as antraquinonas, flavonóides, saponinas, taninos, alcaloides, entre outros (Chevalier, 2000; Oloyede *et al.*, 2010). Para além desses compostos, existem muitos outros com atividade farmacológica, tais como, a morfina, atropina, codeína, esteróides, lactonas e óleos voláteis, cujo valor medicinal é, atualmente, aplicado em tratamentos de diversas doenças (Chevalier, 2000; Trescote *et al.*, 2008; Sousa, 2011). Para além da atividade acima descrita, as plantas medicinais também revelam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-adesivas e analgésicas (Okpuzor *et al.*, 2008; Sukanya *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012; Olorunnisola *et al.*, 2012). Sabe-se que os princípios ativos extraídos são usados para infusões, xaropes, óleos essenciais unguentos e cremes (Sofowora, 1993; Vertuani *et al.*, 2002; Wilkinson e Cavanagh., 2005; Fakeye *et al.*, 2009; Sousa, 2011).

O continente africano possui várias plantas endêmicas, com um elevado potencial agronómico e comercial, contudo muitas dessas espécies, não são valorizados devido ao desconhecimento das suas propriedades físico-químicas e farmacológicas (Gebauer *et al.*, 2002). Na verdade, os frutos são de extrema importância na dieta da população africana rural e também providenciam muitos micronutrientes essenciais. Muitos estudos científicos provaram que os frutos africanos são uma fonte rica em compostos antioxidantes e o seu consumo deve ser promovido com o intuito de resolver muitos problemas derivados do desequilíbrio nutricional das comunidades rurais em África (Afolayan e Jimoh, 2009; Masola *et al.*, 2009; Chadare *et al.*, 2009; Vimalanthan e Hudson, 2009; Buchamann *et al.*, 2010; Nhukarume *et al.*, 2010).

Adansonia digitata L. (família Bombacaceae) é uma árvore nativa da savana Africana, muito usada na medicina tradicional africana, vulgarmente designada como “pequena farmácia” ou “árvore do químico”(Ramadan *et al.*,1994). Esta árvore é importante para os habitantes de África, nomeadamente nos períodos de seca, pois oferecem proteção e providenciam comida, água e material medicinal. O fruto baobab de *Adansonia digitata* divide-se em casca, polpa, sementes. Todos eles foram estudados por vários cientistas devido às suas propriedades benéficas e apresentam-se como recursos naturais para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, suplementos nutricionais, cosméticos e

medicinais (Gruenwald e Galizia, 2005; Wilkison, e Cavanagh, 2005; Wilkinson, 2006; Chadare *et al.*, 2009; Vimalanthan e Hudson, 2009; Fakeye *et al.*, 2009; Blomloff *et al.*, 2010).

O seu uso na indústria cosmética tem ganho particular interesse pois a sua adição nas formulações químicas de cremes faciais e em maquilhagem pode ser uma nova forma de aumentar o prazo de validade dos produtos devido há presença de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis presentes no fruto (Vertuani *et al.*, 2002). No Canadá, por exemplo, recorre-se a este fruto africano para a formulação de cosméticos (Gruenwald e Galizia, 2005; Wilkinson e Cavanagh, 2005; Wilkison, 2006). Para além das aplicações supracitadas, ainda existe outra forma promissora do uso do baobab como alimento funcional devido há sua riqueza em compostos nutracêuticos, definidos como compostos naturais incluídos nos alimentos e que apresentam propriedades benéficas na saúde (Coppens *et al.*, 2006; Moraes e Colla, 2006; Bernal *et al.*, 2010).

Mediante o que foi referido, este trabalho foi desenvolvido com base na avaliação quantitativa de alguns compostos bioativos considerados como os principais responsáveis por conferir atividade antioxidante da polpa do fruto baobab proveniente de Angola. Admitindo que as condições edáficas e climatéricas exercem influência no processo biossintético destes compostos tentou-se averiguar essa hipótese e comparar o fruto angolano de *Adansonia digitata* com outros frutos da mesma espécie mas originários de países diferentes.

Capítulo II. Objetivo

A população mundial tem demonstrado uma crescente preocupação com os cuidados na saúde e, atualmente sabe-se que a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes diminui o risco de ocorrência de doenças.

Este trabalho teve como principal objetivo quantificar os compostos com maior representação a nível de propriedades antioxidantes.

Foram avaliados os teores de ácido ascórbico, fenólicos totais e carotenóides totais na polpa do fruto baobab angolano e analisou-se o seu poder antioxidante pelo método espectrofotométrico do radical livre DPPH[•].

Capítulo III. Revisão Bibliográfica

3.1. A ÁRVORE (*Adansonia digitata* L.)

O género *Adansonia* da família Malvaceae (Bombacaceae) é conhecido por possuir muitos nomes comuns, sendo o “baobab” o mais comum, no entanto, em determinados países como Angola, Namíbia, Moçambique e Madagáscar, também é apelidado como fruto do Embondeiro. À árvore, tal como ao seu fruto, são atribuídos outros nomes de carácter menos científico, tais como árvore do rato morto, devido à forma como os frutos se encontram na árvore, árvore do macaco-pão devido à associação feita à pele do macaco e pelo seu interior seco semelhante à farinha ou árvore de cabeça para baixo devido à morfologia dos ramos esparsos assemelharem-se a raízes. A árvore *Adansonia digitata* também conhecida como arbre de mille ans (árvore dos mil anos) ou calebassier du Sénégal, nome que derivou a Calabaceira como é, atualmente, conhecida na Guiné-Bissau. O género *Adansonia* engloba 8 espécies, em que uma delas cresce na Austrália, sete em África estando seis restritas à ilha de Madagáscar (Gebauer *et al.*, 2002).

Adansonia digitata L. (Figura 1) é uma espécie endémica africana, que se difundiu por diferentes regiões quentes e secas da África Tropical, caracterizada como uma árvore de grande porte, decídua e cuja altura oscila entre os 5 e os 25 metros (excecionalmente 30 m), e cuja longevidade pode atingir centenas ou milhares de anos sob condições favoráveis (Von Maydell, 1990). É conhecida como a “árvore da vida” devido à sua capacidade de retenção de água, bem como ao seu uso tradicional como medicamento e como alimento (Wickens e Lowe, 2008).



Figura 1. A) Árvore *Adansonia digitata* L.. B) Aspeto dos frutos.

Adansonia digitata apresenta ramos grossos, largos e espalhados e um tronco robusto e muito espesso na base, chegando a atingir 10-14 metros em diâmetro. A forma do tronco varia, sendo cônica em árvores jovens, em árvores mais velhas pode ser cilíndrica, em forma de garrafa ou com ramificações perto da base (Gebauer et al., 2002).

A propagação da espécie é realizada, basicamente, por sementes que podem ser recolhidas dos frutos previamente colhidos ou das sementes dos frutos que caem aleatoriamente da árvore. Depois de esmagar a casca, semelhante a uma concha lenhosa e dura, as sementes são extraídas da polpa seca e ácida. As sementes de baobab possuem uma casca muito dura e o processo de germinação é difícil (Sidibe e Williams, 2002). No cultivo intencional, a dormência pode ser terminada através da imersão da semente em água quente durante alguns minutos ou pela remoção total da pele da semente (Osman, 2004). Outro método utilizado para a germinação é por escarificação ácida, que resulta na imersão das sementes em ácido sulfúrico, durante 6 a 12 horas à temperatura de 19°C a 25°C. Este método é reconhecido como um método ideal para a remoção total da pele da semente do fruto e, possibilita o aumento do processo de germinação (Danthu *et al.*, 1995).

3.2. O FRUTO

Adansonia digitata possui um fruto cuja polpa está inserida numa cápsula externa muito resistente, o epicarpo e que pode diferir na forma apresentando, normalmente, 12 a 40 cm de comprimento e 7 a 17 cm de diâmetro, com coloração branca ou rosa, mediante a espécie (Von Maydell, 1990). A parte interna do fruto, o mesocarpo, quando maduro, apresenta um sabor ligeiramente ácido que se deve, essencialmente, há presença de teores elevados de ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico, tartárico, málico, succínico e ascórbico (Nour *et al.*, 1980; Fenner, 1980; Danthu *et al.*, 1995). A polpa do fruto pode ser mastigada, chupada ou comida com leite e ainda pode ser utilizada na preparação de bebidas refrescante, ou utilizada para a confeção de molhos para comida e, quando tostada, pode ser utilizada como repelente de moscas do gado (Kurebgaseka *cit. in* Gruenwald e Galizia, 2005).

No interior do fruto (Figura 2), a polpa encontra-se dividida em pequenos aglomerados, que contêm filamentos (fibras castanhas) que subdividem a fruta por segmentos, sendo necessária para a sua separação apenas um ligeiro processo mecânico, sem nenhum processo de extração, concentração ou tratamento químico, assegurando assim as características de um alimento minimamente processado (Nour *et al.*, 1980).



Figura 2. Apresentação do interior do fruto de *Adansonia Digitata* L., vulgarmente designado por múcua, baobab ou fruto do embondeiro.

3.3. PRINCIPAIS APLICAÇÕES DO FRUTO

A população africana utiliza o baobab quer a nível medicinal quer a nível nutricional, sendo o seu aproveitamento total, ou seja, utilizando-se todos os constituintes da árvore: folhas, casca e frutos (sementes, polpa e casca). Estes benefícios/aplicações medicinais estão relacionados com a presença de certos compostos bioativos, estando descritos os esteróis, triterpenos, saponinas, taninos e polifenóis (Ramadan *et al.*, 1994; Vertuani *et al.*, 2002; Masola *et al.*, 2009).

As sementes do baobab podem ser consumidas secas ou assadas, e muitas vezes substituem o grão de café. Caracterizadas pela sua riqueza proteica, em certos países, como no Sudão, são adicionadas às sopas e a outros pratos confeccionados como suplementos

alimentares (Venter e Venter, 1996; Dirar, 1993). O óleo extraído das sementes também é utilizado para fins terapêuticos, nomeadamente como elixir oral cujas propriedades analgésicas diminuem as dores de dentes (Sidibe e Williams, 2002).

A polpa do fruto é, habitualmente, comida fresca, apresentando um sabor doce-amargo, semelhante ao do tamarindo (fruto originário das savanas africanas mas de uma família diferente o baobab), muito apreciado pelo povo africano, no entanto, a polpa pode ser processada para a obtenção de doces. Por vezes, é usada na preparação de sumos nutritivos onde a polpa seca é misturada com água, sendo posteriormente adicionado açúcar. Também pode ser utilizada na preparação de bebidas alcoólicas espirituosas com baixo teor alcoólico, através da sua mistura com outros compostos (Ibiyemi *et al.*, 1988).

Relativamente aos produtos da árvore, estão descritas inúmeras aplicações para a casca, uma vez que esta produz uma fibra forte ideal para o fabrico de cordas, tapetes, bolsas e chapéus, enquanto as fibras finas da parte interna da casca são utilizadas na indústria da tecelagem (Sidibe e Williams, 2002). A madeira da árvore também é usada, principalmente, como combustível e, em menor escala, como matéria-prima no fabrico de instrumentos musicais (Gebauer *et al.*, 2002; Sidibe e Williams, 2002).

As folhas de *Adansonia digitata* fazem parte da alimentação das populações rurais, especialmente na região central do continente africano. São fontes exógenas ricas em proteínas, usadas como legumes para a confeção de sopas ou cozidas e consumidas como os espinafres, consideradas como uma fonte rica de proteínas, lípidos e micronutrientes, particularmente, cálcio e ferro (Sidibe e Williams, 2002 e Venter e Venter, 1996).

O baobab, como é identificado em Angola, é tradicionalmente usado como antipirético, analgésico, antidiarreico, anti-inflamatório e no tratamento de certas doenças como disenteria, sarampo e varicela (Wickens, 1982). Por sua vez, o sumo da polpa é usado para o tratamento de diarreia e disenteria (Sidibe e Williams, 2002). A casca, bem como a polpa e as sementes do fruto aparentam conter um antídoto para o envenenamento causado por algumas espécies de cobras (Wickens, 1982; Sidibe e Williams, 2002).

3.4. BENEFÍCIOS DO FRUTO DE *ADANSONIA DIGITATA* L.

Nos últimos anos, tem-se verificado uma crescente preocupação com os cuidados de saúde e sabe-se que a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes diminui o risco de ocorrência de certas doenças (Vimalanathan e Hudson, 2009).

Na tentativa de neutralizar os efeitos prejudiciais dos danos oxidativos torna-se conveniente introduzir hábitos alimentares saudáveis, com alimentos ricos em nutrientes com propriedades antioxidantes.

Segundo Manfredini (2002) a polpa do fruto baobab apresenta uma quantidade igual de fibras solúveis e insolúveis (25% de cada) e que podem representar cerca de 45g/100g de produto. As fibras dietéticas são consideradas como componentes importantes da dieta, desempenhando um papel importante na fisiologia do sistema digestivo pela redução do risco de neoplasias no sistema digestivo, particularmente o cancro do cólon, obesidade e diarreias. Devido ao fato das fibras insolúveis não serem digeridas, estas promovem o esvaziamento gástrico, através de estímulos dos movimentos gástricos e o aumento do volume fecal atuando na prevenção de diarreias e na indução da sensação de saciedade fato importante para dietas de baixos níveis calóricos.

Ainda relacionando com a polpa do fruto, um estudo desenvolvido por Ramadan et al. (1994) em ratos provou que a polpa do baobab apresentava atividade analgésica e antipirética, com efeitos semelhantes aos causados pela administração de 50 mg/kg de ácido acetilsalicílico. Esses resultados podem explicar a aplicação de *Adansonia digitata* como antipirético e febrífugo na medicina popular.

Para os extratos da polpa do fruto, das sementes e das folhas também estão descritas propriedades antimicrobianas e antifúngicas, nomeadamente contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia colia*, *Mycobacterium leprae* e *Penicillium crusto-sum*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, respetivamente (Le Grand, 1989).

Também já estão descritos os benefícios da polpa do baobab devido há sua composição em fitoquímicos com propriedades antioxidantes, nomeadamente pelo seu teor elevado em ácido ascórbico que pode variar entre 2.8 a 3g/kg, correspondendo a um teor seis vezes superior ao observado numa laranja (Vertuani *et al.*, 2002).

3.5. COMPOSTOS DE IMPORTÂNCIA FUNCIONAL

Segundo Lajolo (2005) os alimentos funcionais, ou alimentos com alegações de funcionais, são todos os alimentos descritos como alimentos semelhantes ao alimento convencional, consumidos como parte da dieta habitual e que sejam capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis para a manutenção de um bom estado de saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crónicas, para além de cumprir as suas funções nutricionais básicas. Complementando a definição, o autor salienta ainda que pode-se falar em “ingrediente funcional” ou “nutracêutico” o composto responsável pela ação biológica presente no alimento. Estes compostos são designados por fitoquímicos ou compostos bioativos.

Muitos estudos sugerem que o consumo de frutas ricas em compostos fenólicos e outros fitonutrientes contribuem para o bem-estar e saúde do homem, associados com as propriedades antioxidantes dos mesmos (Nhukarume *et al.*, 2010; Compaoré, *et al.*, 2011).

O stress oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre as concentrações de radicais livres e os compostos antioxidantes capazes de neutralizar esses radicais. Muitas vezes, o stress oxidativo ocorre pela incapacidade parcial de resposta do nosso sistema imunológico ou pela exposição excessiva a fatores externos, tais como a poluição a radiação UV, a exposição ao monóxido de carbono. Os compostos bioativos, provenientes da dieta, podem ajudar a suprir esta deficiência conferindo propriedades metabólicas de proteção, prevenção ou até redução dos efeitos causados pelo stress oxidativo (Huong *et al.*, 2005; Rufino *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2012).

Composto antioxidante pode ser definido como uma qualquer substância que, mesmo presente em concentrações baixas, quando comparadas com as concentrações do substrato oxidável, permite um atraso ou inibe o processo de oxidação desse substrato de uma maneira eficaz (Rodrigues *et al.*, 2003). Esta definição generalizada não restringe a atividade antioxidante para nenhum dos grupos de compostos químicos específicos e não se refere a um mecanismo particular de ação (Rice-Evans, 2004).

- 1.
- 2.
- 3.

3.1.

3.2.

3.3.

3.4.

3.5.

3.5.1. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um composto antioxidante importante na nutrição humana (Nour *et al.*, 1980; Ighodalo *et al.*, 1991; Saka *et al.*, 1994; DosSantos e Damon, 1996; Manfredini *et al.*, 2002). A vitamina C é uma das vitaminas mais importantes presente nos frutos e habitualmente usada como agente antioxidante em preparações farmacêuticas, no entanto, quimicamente é uma vitamina fotossensível e termolábil (Penicaud *et al.*, 2010). Por apresentar atividade antioxidante, a vitamina C (Figura 3) é a primeira molécula de defesa contra os radicais livres produzidos pelo oxigênio. Esta vitamina reage diretamente com os radicais superóxidos, hidroxilos e oxigênio singlete e apresenta importância fisiológica devido à sua participação em diversos mecanismos do organismo, tais como, na formação do tecido conjuntivo, produção de hormonas e anticorpos, síntese de aminoácidos não essenciais e prevenção do escorbuto (Ryś *et al.*, 2009).

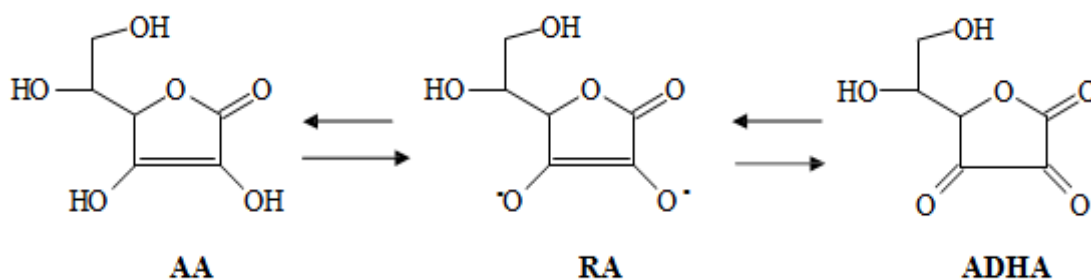


Figura 3. Esquema da reação de oxidação do ácido ascórbico (AA) a ácido desidroascórbico (ADHA), com a formação do radical ascorbilo como composto intermediário (Buettner e Schafer, 1997).

A polpa da fruta do baobab é reconhecida pelos seus elevados teores de vitamina C, apresentando particular interesse quando comparada com outros frutos cuja característica principal se prende com o seu teor elevado em ácido ascórbico (Tabela 1).

Tabela 1- Comparação dos teores de vitamina C (mg/100 g) de algumas frutas, incluindo o baobab (adaptado de Vertuani *et al.*, 2002).

Frutos	Nome científico	mg ácido ascórbico/100g produto
Baobab	<i>Adansonia digitata</i>	150 – 499
Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	52 – 120
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	46
Maçã	<i>Malus sylvestris</i>	6
Pêssego	<i>Prunus persica</i>	4 – 13
Morango	<i>Fragaria x ananassa</i>	61

A capacidade antioxidante do fruto de *Adansonia digitata* está bastante estudada devido ao seu elevado conteúdo em compostos antioxidantes (Vertuani *et al.*, 2002; Besco *et al.*, 2007; Lamien-Meda *et al.*, 2008; Blomhoff *et al.*, 2010). Mediante as características supracitadas, o fruto baobab é comumente utilizado em África como substituto do leite materno uma vez que a sua riqueza em vitamina C promove a capacidade absorptiva do ferro e do cálcio (Wickens e Lowe, 2008).

- 1.
- 2.
- 3.
- 3.1.
- 3.2.

3.3.

3.4.

3.5.

3.5.1.

3.5.2. Compostos Fenólicos

Do metabolismo secundário das plantas são sintetizados os compostos fenólicos, essenciais para o sistema de defesa das mesmas. Estes compostos formam-se sob condições de stress, tais como infeções, danos celulares, exposição intensa às radiações UV e, normalmente, atuam como agentes antioxidantes e antimicrobianos nos tecidos vegetais (Naczki e Shaidi, 2004).

Os compostos fenólicos são todos aqueles que não sendo compostos azotados apresentam um ciclo ou ciclos aromáticos e derivam do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato. No reino vegetal estão descritos mais do que 8000 compostos fenólicos. Estima-se que o consumo de elevados teores de frutas por dia, promovam a ingestão de 1g de fenólicos totais. O grupo dos compostos fenólicos pode-se dividir em compostos flavonóides (Figura 4) e não flavonoides, onde são incluídos as antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis (catequinas) e as proantocianidinas e os ácidos fenólicos e cumarinas, respetivamente (Karakaya, 2004; Proença da Cunha, 2005).

Relativamente ao seu potencial antioxidante, estes compostos interagem, preferencialmente, com o radical peróxido (ROO) devido à sua maior prevalência durante a etapa de auto-oxidação e também devido ao facto de possuírem menor carga energética comparativamente com outros radicais, o que permite o favorecimento da remoção do seu hidrogénio. O fenóxido (radical resultante) embora relativamente estável pode interferir na reacção de propagação ao reagir com um radical peróxido e o composto resultante, através da acção da luz ultravioleta e de temperaturas elevadas, poderá promover a formação de novos radicais, comprometendo a eficiência do composto antioxidante, uma vez que a eficiência é determinada pelos grupos funcionais presentes, pelo tamanho da cadeia desses grupos e pela posição que ocupam no anel aromático característico destes compostos (Priscila e Neuza, 2007).

Nos frutos, os polifenóis são compostos bioativos responsáveis pelo efeito protetor de doenças, como a doença coronária, cancro e diabetes (Asami *et al.*, 2003). Vários estudos *in vitro* têm comprovado que os flavonóides podem inibir ou induzir o mecanismo de catálise enzimática em processos reguladores do metabolismo humano, tais como, divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, destoxificação, resposta inflamatória e imune do organismo humano (Seinfried *et al.*, 2007 e Williams *et al.*, 2004).

Como agentes antioxidantes, poder-se-á referir que o grupo dos flavonóis apresentam maior atividade antioxidante do que o grupo das flavonas devido há presença do grupo hidroxilo nas posições 5 e 7 do anel A. A quercetina, 3, 5, 7, 3', 4'- pentahidroxiavona, um dos flavonóides mais comumente encontrado nos alimentos, especialmente nos frutos, é considerado como um antioxidante por excelência devido há presença de grupos hidroxilos no anel B e também pela presença da dupla ligação no anel C (William *et al.*, 2004).

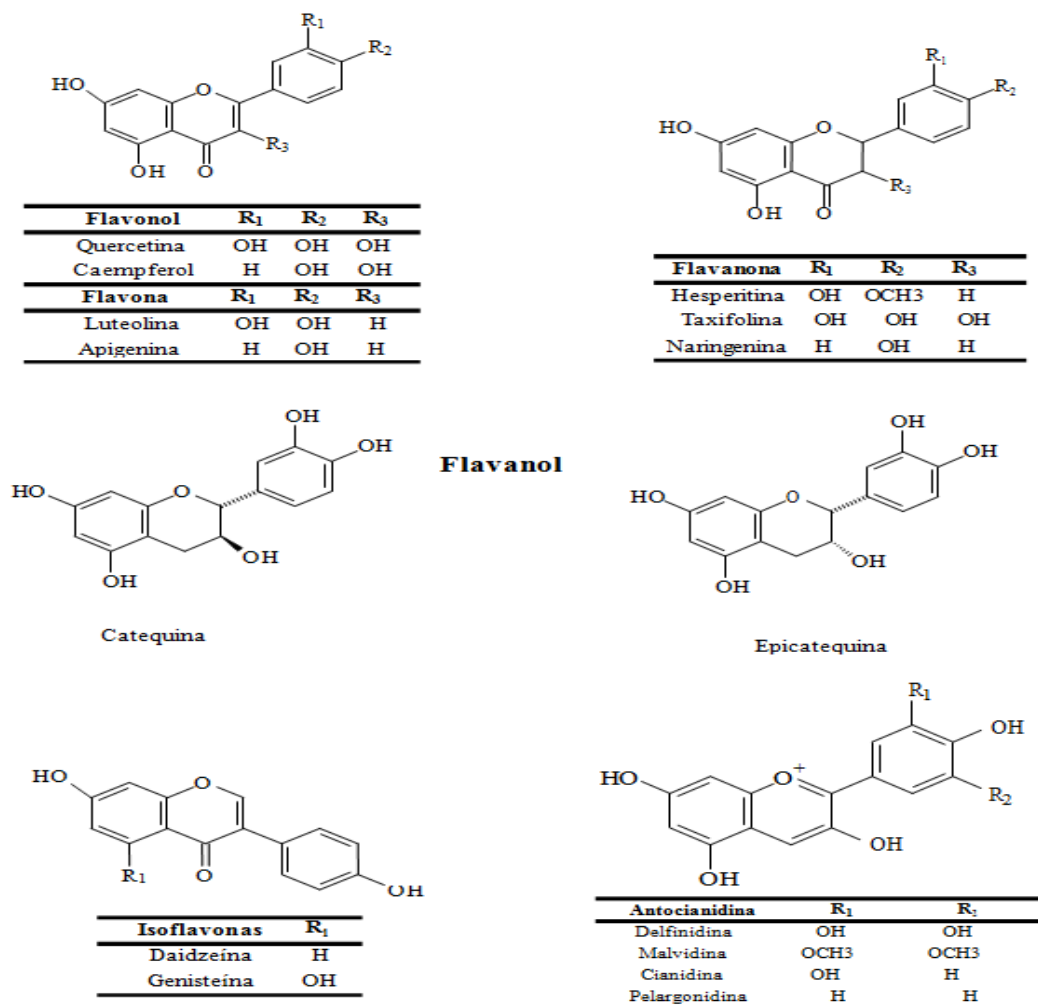


Figura 4. Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídas na natureza.

Os flavonóides têm inúmeras funções na natureza e formam um vasto grupo de metabolitos secundários com atividades biológicas muito diversas. Estes sintetizam-se nas plantas e participam na fase luminosa da fotossíntese durante a qual catalisam o transporte de elétrons. A sua formação tem lugar a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e também de unidades de acetato. Os flavonóides eram referidos como constituintes vacuolares ou aparecendo nas ceras das folhas e nos exsudados, mas, recentemente descobriu-se que também podem estar ligados à parede celular.

Desde 1936, ano em que Szent Gyorgyi descobriu a ação anti-hemorrágica, que muitas das propriedades terapêuticas têm sido atribuídas aos compostos polifenólicos. Das principais atividades biológicas destes compostos, destacam-se o efeito

cardioprotetor capaz de reduzir a mortalidade por doenças coronárias; atividade antiperoxidativa a nível das membranas celulares do fígado; atividade antioxidante; inibidores da carcinogénese pulmonar antitumoral; atividade antibacteriana. Considerando-se os flavonóides, de entre os compostos fenólicos, relativamente pouco tóxicos para o homem, estes induzem o interferão (atividade antiviral), inibem a atividade da tirosina cinase dos produtos oncogénicos e inibem a síntese do DNA nas células tumorais, permitindo a inibição da proliferação celular anormal. Também estão descritas outras ações fisiológicas, como a atividade antidiarreica; protetores solares; atividade estrogénica de algumas isoflavonas (Hollman *et al.*, 1996; Tapas *et al.*, 2008; Lafuente *et al.*, 2009).

3.5.3. Carotenóides

Os carotenóides são um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais, devido à sua vasta distribuição, diversidade estrutural e numerosas funcionalidades. Apesar das plantas serem a sua principal fonte, também são encontrados em animais e microrganismos. Os carotenóides são responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarelo das folhas, frutos e flores, assim como das cores de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos (Vinha, 2005). Estes compostos caracterizam-se por possuírem pelo menos 10 duplas ligações conjugadas, o que explica a sua coloração amarelada ou alaranjada, a sua elevada capacidade de fixação do oxigénio monomolecular durante os processos fotoquímicos e o seu poder antioxidante.

Nos últimos anos, tem sido dada especial atenção à presença e concentrações de carotenóides presentes nas matrizes alimentares devido ao fato de estes contribuírem beneficemente em diversas atividades fisiológicas. A análise de carotenóides é complexa, devido à sua diversidade e há presença das suas formas isoméricas *cis-trans*. Além disso, uma grande variedade de alimentos de origem vegetal e animal contêm carotenóides (Vinha, 2010). O sistema conjugado de dupla ligação nos carotenóides produz particular instabilidade, especialmente em condições de luminosidade, calor, oxigénio e ácidos, constituindo os principais problemas na manipulação de carotenóides. Os carotenóides presentes nos legumes e frutos têm uma ação preventiva

sobre as afeções degenerativas, o que tem sido explicado pela atividade antioxidante, principalmente devida aos carotenos (Tabart *et al.*, 2009).

Os carotenos (β , γ e α) e a criptoxantina são pró-vitaminas A que depois é transformada pelos animais em retinol (vitamina A). Esta vitamina atua sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (processos bioquímicos essenciais) e sobre a visão, através da ativação da rodopsina (pigmento da retina) extremamente sensível à luz e indispensável para a visão sob escassa luminosidade (Proença da Cunha, 2005).

Muitos estudos mostram uma forte correlação entre a ingestão de carotenóides e a diminuição dos riscos de algumas doenças, como cancro, aterogénese, calcificação óssea, degeneração ocular e danos neuronais (Tabart *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2007 e Javanmardi e Kubota, 2006). O risco reduzido de alguns tipos de cancro e a baixa incidência de doenças isquémicas cardíacas tem sido atribuído à ação farmacológica dos carotenóides, particularmente do licopeno e do β -caroteno (Barba, 2006; Javanmardi e Kubota, 2006; Lam *et al.*, 2007; Tabart *et al.*, 2009).

3.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Conforme referido anteriormente, os compostos antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato. Existem duas categorias de antioxidantes, nomeadamente os de origem natural e os designados sintéticos (Touré e Xueming, 2010; Cheung *et al.*, 2003).

As plantas que se encontram num clima quente, como no continente africano, estão sujeitas a temperaturas elevadas e encontram-se demasiado expostas à luz solar. Assim, para sobreviverem a fatores tão agressivos, desenvolveram a capacidade de produzir compostos capazes de as proteger contra as radiações ultravioleta, minimizando o efeito da degradação oxidativa e o envelhecimento prematuro (Touré e Xueming, 2010).

Para avaliar a importância da atividade antioxidante, é essencial conhecer o mecanismo de formação dos radicais livres e a subsequente degradação dos produtos

alimentares. Um radical livre é qualquer espécie com existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados. A presença destes elétrons torna as espécies altamente reativas. A formação desses radicais ocorre na rutura de uma ligação covalente, em que cada elétron partilhado fica no seu átomo, num processo designado por cisão homolítica.

As características químicas dos antioxidantes incluem a sua solubilidade, habilidade regenerativa, relação estrutura/atividade e biodisponibilidade, que são fatores importantes quando se considera o papel destes compostos na saúde humana (Kaur e Kapoor, 2002). Stahl e Sies (2003, 1996) sugeriram que as interações entre compostos estruturalmente diferentes e que possuam atividade antioxidante variável promovem a proteção adicional contra o stress oxidativo.

Na verdade, é já do conhecimento geral que os compostos antioxidantes são importantes na prevenção de doenças e alguns antioxidantes também são capazes de sequestrar iões metálicos (ferro ou cobre), cofatores importantes para o desenvolvimento da oxidação lipídica (Vinha *et al.*, 2012a; 2012b).

Os antioxidantes ajudam a prevenir o stress oxidativo associado a doenças como cancro, envelhecimento, inflamatório, doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, enfarte do miocárdio e Alzheimer devido à eliminação dos radicais livres que contribuem para essas doenças (Kaur e Kapoor, 2001; Lako *et al.*, 2007; Blomhoff *et al.*, 2010; Neergheen *et al.*, 2010). É do conhecimento geral que uma dieta rica em frutos e vegetais, e como tal rica em vitamina C e E assim como em carotenóides e compostos fenólicos, ajudam a prevenir doenças oxidativas (Glew *et al.*, 2005, Kaur e Kapoor, 2002 e Leung, 1968).

Servindo como base o seu elevado poder antioxidante, vários autores têm concluído que o fruto de *Adansonia digitata* é o novo ingrediente “milagroso” para a promoção da saúde (Vertuani *et al.*, 2002; Lako *et al.*, 2007).

3.6.

3.6.1. Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

Tendo em vista uma rápida avaliação da eficácia antioxidante de compostos químicos ou extratos vegetais, muitos investigadores seguiram os mesmos procedimentos em diferentes estudos realizados até à data. Segundo Anderson e Phillips (1999), a utilização de métodos *in vitro*, cuja finalidade é a avaliação do potencial benéfico dos compostos antioxidantes, está repleta de dificuldades experimentais. As reações envolvidas na oxidação e redução são extremamente sensíveis ao meio no qual elas ocorrem, particularmente, à concentração de oxigénio, à presença de iões metálicos de transição e aos numerosos compostos com potencial óxido-redução. Assim, não é rara a obtenção de resultados contraditórios na avaliação de um único composto antioxidante, utilizando-se diferentes sistemas *in vitro*.

Van Boekel e Jongen, em 1997 publicaram que os alimentos são matrizes complexas com vários fatores que interagem entre si. Desse modo, medir a capacidade antioxidante de alimentos pode estabelecer uma classificação de alimentos saudáveis. Existem diversos componentes antioxidantes em tecidos animais e vegetais, o que torna relativamente difícil medir a ação de cada componente antioxidante separadamente. Além disso, pode existir o efeito sinérgico entre os diferentes compostos antioxidantes presentes no alimento. Desse modo, a atividade antioxidante total da amostra pode ser maior do que a soma da atividade de cada composto, quando medida isoladamente. Nesse caso, o isolamento de um composto não refletirá exatamente a sua ação antioxidante. Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos biológicos, com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante total das amostras (Brand *et al.*, 1995).

Os investigadores Niki, em 2002, e Van Boekel e Jongen (1997), sugeriram que a avaliação da bioatividade, como a capacidade antioxidante, pode ser mais útil quando se considera a avaliação dos benefícios gerais dos alimentos do que a avaliação de um micronutriente específico, especialmente no caso de alimentos processados. Os testes acelerados, recorrendo a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica), permitem estimar, de forma

rápida, a estabilidade oxidativa de ácidos gordos ou a eficácia “teórica” de um antioxidante, isolado ou em associação. Uma vez que os fenómenos naturais de oxidação são processos lentos, desenvolvendo-se frequentemente ao longo de vários meses. Deste modo, os testes de estabilidade acelerados assumem particular importância na rotina analítica (Silva *et al.*, 1999).

3.6.1.1. Método do radical livre DPPH[•]

O método do DPPH[•] utiliza o radical livre disponível comercialmente DPPH[•], que é solúvel em metanol (Brand *et al.*, 1995). O grau de descoloração do radical DPPH[•] a 517 nm pela ação dos antioxidantes é medido espectrofotometricamente numa solução metanólica até o valor de absorvância permanecer constante e indicar a eficiência do antioxidante adicionado na remoção do radical. Alguns autores recomendam a utilização do método do DPPH[•] por ser uma metodologia analítica fácil e precisa na avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de frutas e/ou legumes.

O modelo de sequestro do radical estável DPPH[•] é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante num intervalo de tempo considerado relativamente curto, quando comparado com outros métodos analíticos descritos. O efeito dos antioxidantes no sequestro do radical DPPH[•] é atribuído à capacidade desses compostos doarem hidrogénio. Este método foi reconhecido por Leong e Shui (2002) como uma “ferramenta” útil na avaliação da capacidade antioxidante total dos frutos.

De acordo com Niki (2002), vários métodos têm sido utilizados para avaliar a atividade antioxidante, no entanto, não existe, ainda, uma metodologia simples e universal que meça a ação antioxidante de uma forma qualitativa e quantitativa. Segundo o autor, existem dois pontos que devem ser tomados em consideração durante a medição: (a) a eficácia do sequestrador de radicais livres, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante em direção ao radical livre, mas também atendendo à sua concentração; (b) a eficácia do sequestrador mediante a sua localização. Por exemplo, a vitamina C pode ser considerada como um bom sequestrador de radicais

hidrofílicos, porém não exerce boa função sequestrante em radicais de natureza lipofílica.

Capítulo IV. Materiais e Métodos

4.1. MATERIAL

Durante a seleção aleatória das amostras do fruto baobab estudado, tentou-se controlar diversos fatores de forma a não interferir no rigor dos resultados, nomeadamente, espécie e região da colheita do fruto, condições de transporte e armazenamento.

Foram analisados frutos de *Adansonia digitata* L. (Figura 5) provenientes de Angola, cidade de Benguela, colhidos em Novembro de 2011, época ideal para o seu consumo. Os frutos inteiros foram transportados de avião, hermeticamente selados e acondicionados a não sofrerem danos físicos nos frutos que poderiam influenciar negativamente as propriedades químicas do mesmo.



Figura 5. Aspeto interior do fruto de *Adansonia digitata* L.

As amostras foram preparadas vinte e quatro horas após receção. Os frutos foram cortados, removendo-se a casca dura e separando-se a polpa das fibras. Para proceder à separação total da semente envolvida pela polpa, recorreu-se à utilização de um raspador manual, de forma a garantir quantidade de polpa suficiente para a realização das determinações analíticas.

4.2. REAGENTES

O reagente de Tillmans (2,6 diclorofenol), carbonato de sódio, ácido oxálico, etanol, n-hexano, acetona e o ácido ascórbico foram obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. O metanol, o reagente de Folin-Ciocalteu, hidróxido de sódio e o ácido gálico foram adquiridos da Panreac Química Lda., Portugal. Todos os reagentes e soluções foram preparados através de um sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA). O antioxidante sintético BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol), utilizado como controlo para a atividade antioxidante foi obtido da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

4.3. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

4.

4.1.

4.2.

4.3.

4.3.1. Ácido ascórbico (Vitamina C)

Diluíram-se 5g de amostra, previamente homogeneizada, em 90 mL de ácido oxálico (0,4%). Após homogeneização total, tomou-se uma alíquota de 2 mL, à qual foram adicionados 50 mL de água destilada para posterior titulação com reagente de Tillmans (Pregmolatto e Pregmolatto, 1985). O método analítico baseia-se na redução do 2,6-diclorofenol (DIP) pelo ácido ascórbico através de uma titulação direta utilizando-se a fenolftaleína como indicador. A quantidade de ácido ascórbico nas amostras foi obtida com base numa curva padrão do ácido ascórbico ($y=2.047x - 1.021 \times 10^{-2}$, $r^2=0.99521$) e os resultados foram expressos em mg ácido ascórbico/100g amostra.

4.3.2. Quantificação dos fenólicos totais

A extração dos compostos fenólicos seguiu o procedimento descrito por Genovese *et al.*, (2003) para a determinação do conteúdo fenólico total nos frutos, usando o reagente Folin-Ciocalteu para a quantificação espectrofotométrica. A amostra (5g) foi homogeneizada em 100 mL de metanol/água (80%), durante 1 hora, mantendo-se constante a temperatura e a velocidade de agitação. O sobrenadante obtido foi

filtrado, em sistema de vácuo, e o volume final corrigido com metanol para 100 mL. A determinação dos fenólicos totais foi realizada de acordo com Zieliski e Kozowska (2000) com algumas alterações. Do filtrado final da amostra, tomaram-se 0,5 mL, adicionando-se 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. A solução foi homogeneizada e, após 3 minutos, acrescentou-se 1 mL de solução saturada de NaCO₃. Posteriormente, as soluções ficaram em repouso durante 1 hora ao abrigo da luz, para o desenvolvimento da cor, através da redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, em meio alcalino. As leituras das absorvâncias foram obtidas a 720 nm por espectrofotometria (Shimadzu UV-2100), utilizando o ácido gálico (GA) como padrão e os resultados foram expressos em mg (GAE)/100g de amostra ($y = 0.581x + 0.203$; $r^2 = 0.9892$).

4.3.3. Quantificação do teor de carotenóides totais

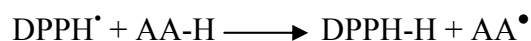
Foram pesadas 5g de amostra de polpa do fruto, adicionando-se 40 mL de acetona pura. Após agitação constante durante 15 minutos ao abrigo da luz, filtrou-se sob vácuo, adicionando-se, posteriormente ao resíduo, 30 mL de éter de petróleo, repetindo-se por mais duas vezes. A solução resultante foi transferida para uma ampola de decantação, realizando-se uma lavagem exaustiva com água destilada, até à obtenção de duas fases totalmente distintas. A quantificação dos carotenóides, previamente separada e medida volumetricamente, foi realizada por espectrofotometria UV/Vis, a um comprimento de onda de 450 nm, usando o éter de petróleo como branco, de acordo com a fórmula abaixo representada, onde o coeficiente de extinção para a quantificação dos carotenóides totais é de 2,592 (Almeida e Penteado, 1988).

$$\mu\text{g de carotenóides/g amostra} = \frac{\text{Abs} \times \text{Volume} \times 10^6}{100 \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{Peso da amostra}}$$

4.3.4. Método do radical DPPH[•]

O ensaio de captura de radicais DPPH[•] adaptado por Brand-Williams (1995) tem como base a redução do radical (DPPH[•]), que ao fixar um H[•] (removido pelo

antioxidante em estudo) origina uma diminuição da absorvância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação química, a quantidade de antioxidante gasta, capaz de reduzir 50% do radical DPPH[•].



As amostras da polpa do fruto, realizadas em triplicado, foram diluídas em metanol (80%) obtendo-se uma concentração de 0,1mg/mL e para o padrão (BHT), utilizou-se a mesma concentração (0,1 mg/mL) para que a comparação entre os resultados obtidos fosse mais rigorosa. Uma alíquota de 1,5 mL de solução metanólica do radical DPPH[•] (20 mg/L) foi adicionada a 0,5 mL dos extratos metanólicos para a concentração supracitada.

Capítulo V. Resultados e Discussão

As informações a respeito das características químicas e do valor nutricional dos frutos são ferramentas básicas para a avaliação do consumo e possível formulação de novos produtos. No entanto, até à data, constata-se a falta de publicações acerca da composição química do fruto baobab angolano. Por esse motivo neste trabalho foram estudados os teores dos compostos antioxidantes com maior representação no fruto, o que irá permitir, futuramente, o desenvolvimento de mais estudos nesta matriz alimentar. Também é importante salientar que muitos dos frutos nativos de Angola ainda são utilizados apenas pela população angolana, apresentando pouco ou nenhum valor comercial, uma vez que a comercialização destes frutos é feita em feiras livres, ou mercados tradicionais.

A identificação e quantificação dos compostos bioativos provenientes dos frutos têm merecido maior atenção por parte dos investigadores, devido à sua importância nutricional. Para além disso, a diversidade destes compostos aumentou, não só devido às diferentes estruturas químicas como também mediante a sua dispersão e concentração nos tecidos vegetais, razões pelas quais promoveram o desenvolvimento de técnicas analíticas para permitir a identificação e a quantificação desses compostos.

O ácido ascórbico é utilizado como aditivo alimentar devido ao seu poder antioxidante, capaz de estabilizar os radicais livres formados pela ação do oxigénio (Nhukarume *et al.*, 2008). Essa característica permite justificar a sua presença nos alimentos, desempenhando um papel relevante na preservação de nutrientes dos alimentos, como também, no aumento do tempo de vida útil dos mesmos. Para além disso, o ácido ascórbico é um nutriente essencial e que deve ser ingerido diariamente. Pela pesquisa realizada e citada ao longo deste trabalho, verificou-se que a polpa do

fruto baobab caracteriza-se pelo elevado teor de vitamina C, ultrapassando o kiwi, o morango e a laranja.

Tabela 2- Teor de ácido ascórbico obtido na polpa do baobab angolano.

Amostra	(mg ácido ascórbico/100g)
Polpa ^a	216 ± 0,54

^a valores correspondentes à média ± desvio padrão. As determinações analíticas foram realizadas em triplicado (n=3).

O valor experimental obtido para o fruto estudado foi de 216 mg/100g. Segundo Bresco e colaboradores (2007), os teores de ácido ascórbico variam entre 150 - 499 mg/100g, independentemente da origem geográfica do fruto, o que está de acordo com o resultado obtido.

Devido às propriedades físico-químicas da vitamina C, esta sofre degradação quando presente em frutos com elevados teores de humidade. A sua perda também se manifesta durante o período de armazenamento. Uma vez que a polpa do fruto baobab apresenta um teor de humidade pouco representativo, esta vitamina não sofre degradação e, de uma maneira geral, até tende a aumentar a sua concentração devido às condições climáticas adversas que podem promover a formação de radicais livres. Nestas condições, os frutos desenvolvem condições metabólicas de defesa, promovendo a biossíntese de compostos secundários com propriedades antioxidantes, que se acumulam tanto no fruto como nas sementes do mesmo.

Embora a concentração de ácido ascórbico seja significativa, convém referir que a escolha do método analítico para a sua quantificação é fundamental de forma a evitar processos degradativos da matriz natural. O recurso a métodos de proteção como a adição intencional de antioxidantes durante o processo de extração ou o uso de atmosferas inertes. As condições empregues durante a fase de extração devem, por isso, evitar a oxidação, degradação térmica e outras modificações químicas

e bioquímicas na amostra. Os métodos utilizados para a análise de compostos fenólicos por exemplo, podem ser classificados pela determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos. Na verdade, a característica antioxidante da vitamina C, da vitamina E, dos carotenóides e dos compostos fenólicos torna-os suscetíveis à degradação pela oxidação, que pode ser influenciada pela presença de oxigénio, luz, calor e iões metálicos. Outro fator que dificulta a comparação dos resultados é a variedade de metodologias usadas para determinar o conteúdo dos compostos bioativos e, principalmente, para determinar a atividade antioxidante do alimento em causa.

Conforme já foi referido ao longo deste trabalho, os compostos fenólicos e os carotenóides também potenciam a atividade antioxidante de um fruto. Assim, na Tabela 3 estão resumidos os teores de fenólicos e carotenóides totais encontrados na polpa do fruto angolano. A análise de compostos fenólicos e de carotenóides é influenciada pela natureza dos compostos, o método de extração utilizado, o tamanho da amostra, o tempo de extração, as condições de armazenamento, o padrão utilizado e a presença de compostos que podem funcionar como interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas.

Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos totais, carotenóides totais da polpa do baobab (*Adansonia digitata*), em mg/ 100g de amostra. A atividade antioxidante foi expressa em percentagem.

	Fenólicos totais	Carotenóides	Atividade antioxidante (%)
Polpa ^a	122,0 ± 0,05	0,295 ± 0,5	88,30±1,36
BHT ^a	-	-	96,09±0,98

^a valores correspondentes à média ± desvio padrão n=3

Para o extrato metanólico foi encontrada uma concentração de fenóis totais de 122mg/100g em equivalentes de ácido gálico, enquanto o teor de carotenóides foi significativamente inferior (0,295 mg/100g).

Os valores de fenólicos totais encontrados são bastante inferiores aos descritos por Lamien–Meda *et al.* (2008), com 3518,33 mg GAE/100g, no entanto, a solubilidade dos compostos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado,

do grau de polimerização e das possíveis interações que possam ocorrer com outros constituintes dos alimentos e que podem promover a formação de complexos insolúveis. Por outro lado, muitos autores referem que os teores de fenólicos presentes nos frutos estão diretamente relacionados com as condições edáficas e climáticas da região de cultivo (Troconis-Torres *et al.*, 2012; Vinha *et al.*, 2012a, 2012b). Os nossos resultados também foram discordantes com os resultados obtidos por Compaoré *et al.* (2011), que afirmaram teores de fenólicos totais no fruto angolano semelhantes aos presentes em frutos de outros países.

Por outro lado, o processo de conservação das amostras exerce influência na quantificação dos compostos bioativos. Segundo Asami *et al.* (2003) os frutos congelados permitem uma maior extração de compostos fenólicos totais devido à rutura dos tecidos das células do fruto pelos cristais de gelo. Por sua vez Meda *et al.* (2008) demonstraram que os extratos do fruto recorrendo à acetona como solvente extrator apresentavam maior conteúdo de flavonóides e de fenólicos. Logo será mais vantajoso o uso da acetona para fazer a extração, nomeadamente, para a obtenção de compostos bioativos que possam ser incorporados na indústria farmacêutica, como suplementos ou numa vertente terapêutica. No entanto, e como garantia, da validade destes resultados, deve-se referir que em estudos posteriores deverão ser feitas novas extrações, recorrendo-se a diferentes solventes, idealmente sem toxicidade para a saúde, como água ou etanol.

Os carotenóides constituem um grupo de compostos lipossolúveis, amplamente distribuídos entre as plantas e alguns animais, em quantidade apreciável, responsável pelas colorações entre amarelo e vermelho, observadas nos produtos vegetais e animais. A importância dos carotenóides não se restringe ao seu papel pigmentante, pois estes compostos apresentam atividade antioxidante. Estudos epidemiológicos demonstram que dietas ricas em carotenóides estão associadas à redução do risco de incidência de cancro e doenças cardiovasculares bem como na proteção das membranas celulares e das lipoproteínas (Bender, 2005).

O teor médio de carotenóides encontrado na polpa do fruto baobab foi de 0,295mg/100g. Este valor, embora significativamente inferior ao encontrado nos

fenólicos totais poderá apresentar relevância quando comparado com outros estudos. Após pesquisa bibliográfica, verificou-se que poucos estudos referem a quantificação destes compostos na sua totalidade, no entanto, num estudo publicado em 2010, estão descritos teores de α -caroteno e luteína (0,17 μ g/g e 1,53 μ g/g, respetivamente), compostos que pertencem à classe dos carotenóides (Sena *et al.*, 1998 *cit.* Caluwé *et al.*, 2010).

A grande diversidade de métodos analíticos (químicos, físicos e /ou físico-químicos) descritos para avaliar o grau de oxidação lipídica e a atividade antioxidante coloca, na prática, algumas dificuldades na seleção do método. Van Boekel e Jongen, (1997) publicaram que os alimentos são matrizes complexas e contêm vários fatores que interagem entre si. Desse modo, medir a capacidade antioxidante de alimentos, neste caso concreto frutos, pode estabelecer uma classificação errada de alimentos saudáveis. Existem diversos componentes bioativos nos tecidos vegetais, o que torna relativamente difícil medir a ação antioxidante de cada componente separadamente. Além disso, pode existir o efeito sinérgico entre os diferentes compostos antioxidantes presentes no alimento. Alguns autores recomendam a utilização do método do DPPH[•] por ser uma metodologia analítica fácil e precisa na avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de frutas e/ou legumes (Leong e Shui, 2002). Por outro lado, a atividade antioxidante dos extratos dos frutos depende da polaridade do solvente extrator, dos procedimentos de isolamento, da pureza dos compostos ativos, da técnica do ensaio e do substrato usado (Arnao, 2000 e Chun., *et al.* 2005). A quantidade total de compostos fenólicos e de outros substituintes redutores no extrato podem contribuir para a capacidade antioxidante de um extrato (Arnao, 2000).

Os resultados apresentados na Tabela 2, permitem concluir que o extrato metanólico da polpa do fruto baobab apresentou uma atividade antioxidante significativamente elevada quando comparada com a amostra controlo, ou seja, com antioxidante sintético BHT (88,3% e 96,09%, respetivamente). Estes valores são muito superiores aos publicados por Besco *et al.*, (2007), os quais descreveram apenas 11% de atividade antioxidante, atribuídos ao teor de ácido ascórbico como maior contribuinte presente na matriz. No entanto, num outro estudo defendeu-se a ideia de que a capacidade antioxidante da polpa e das folhas de *Adansonia digitata* está relacionada com um componente da planta em estudo, ou com o tipo de processamento ocorrido

(trituração das folhas, e separação mecânica da polpa da fruta), conferindo a manutenção das características naturais (Vertuani *et al.*, 2002).

Em suma, após comparação de estudos, pode-se afirmar que o fruto baobab apresenta elevada atividade antioxidante devido, essencialmente, ao seu elevado conteúdo em ácido ascórbico e fenólicos totais. Muitos estudos deverão ainda ser realizados com o objetivo final de efetuar a caracterização química completa deste fruto, bem como avaliar a atividade antioxidante por diferentes métodos analíticos de forma a reproduzir maior credibilidade analítica aos resultados encontrados.

Capítulo VI. Conclusão

O desenvolvimento científico tem levado a diferentes abordagens sobre a relação estabelecida entre a dieta e a saúde. Uma das mais estimulantes linhas de pesquisa das últimas décadas surgiu com a descoberta de um grupo de nutrientes que apresenta efeitos protetores contra a oxidação celular. Estes compostos, que se encontram naturalmente nos frutos, atuam como antioxidantes no organismo por meio do sequestro de radicais livres, que estão relacionados com a maioria das doenças crônicas não-transmissíveis.

A eficácia da ação antioxidante dos compostos bioativos depende da sua estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento. Em função da grande diversidade química existente, particularmente, entre os compostos fenólicos, têm sido desenvolvidos vários métodos analíticos para avaliar a capacidade antioxidante das infindáveis amostras alimentares. Alguns deles determinam a capacidade dos antioxidantes sequestrarem os radicais livres formados durante a reação e outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica, através da quantificação dos produtos formados pela reação, como dienos conjugados, hidroxiperoxídeos ou produtos derivados da decomposição da peroxidação lipídica. Não obstante à diversidade de métodos para avaliar a atividade antioxidante, poder-se-á afirmar a título de conclusão, que não existe até à data nenhum procedimento metodológico universal.

Preconiza-se na literatura que os frutos e os vegetais são excelentes fontes de compostos antioxidantes, característicos de cada matriz alimentar, destacando-se os fenólicos e a vitamina C como os predominantes nos frutos. A polpa do fruto de *Adansonia digitata*, proveniente de Angola, apresenta atividade antioxidante elevada

evidenciando-se, uma vez mais, o seu elevado interesse e possível divulgação pelos países europeus para o hábito de consumo e promoção da saúde pública em geral.

Este estudo, embora preliminar, mostrou que é fundamental realizarem-se mais determinações analíticas, cuja finalidade baseia-se na caracterização nutricional do baobab angolano e promover a divulgação dos dados obtidos, não só para atribuir maior valorização económica ao fruto, como pelo potencial fitoquímico na incorporação de suplementos alimentares e farmacológicos.

Capítulo VII. Bibliografia

Adebajo, A. O., Adewunmi, C. O. e Essien, E. E. (1983). Anti-infective agents of Higher plants. 5th Internacional Symposium *In: Adebajo, A.O. Medicinal Plants*. University of Ife (OAU). Nigeria. pp. 152-158.

Almeida, L.B. e Penteado, M.V.C. (1988). Carotenoids and pro-vitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). *Journal of Composition and Analysis*, 1, pp. 249-258.

Anderson, D. e Phillpis, J.B. (1999). Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp. 1015-1025.

Afolayan, A. J. e Jimoh, F.Q. (2009). Nutritional quality of some wild leafy vegetables in South Africa. *International Journal Food Science Nutrition*, 60(5), pp. 424-431.

Ajose, F.O. (2007). Some Nigerian plants of dermatologic importance. *International Journal of Dermatology*, 46(1), pp. 48-55.

Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids – Secrets of Life Alcaloid Chemistry, Biological Sgnificance, Applications and Ecological Role*. Elsevier. Netherlands.

Arnao, B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Science Technology*, 11, pp. 419-421.

Asami, D.K., *et al.* (2003). Comparison of total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marioberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agriculture practices. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51, pp. 1237-1241.

Barba, A.I.O. (2006). Application of UV-Vis detection–HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95, pp. 328-336.

Bender, D.A. (2005). *As vitaminas*. In: Gibney, M. J., Vorster, H.H., Kok, F.J. (Ed.). *Introdução à nutrição humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 8, pp. 114-161.

Bernal, J. *et al.* (2010). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 55(4), pp. 758-774.

Besco, E. *et al.* (2007). The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobabb products. *Food Chemistry*, 102, pp. 1352-1356.

Blomhof, R. *et al.* (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutritional Journal*, 9 (1), pp. 3.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 28, pp. 25-30.

Buchmann, C. *et al.* (2010). The Importance of baobabb (*Adansonia digitata* L.) in Rural West African Subsistence – suggestion of a cautionary approach to international market export of baobabb fruits. *Ecology of Food and Nutrition*, 49(3), pp. 145-172.

Buettner, G.R. e Schafer, F.Q. (1997). Ascorbate (vitamin C) its antioxidant chemistry. *Oxygen Society of Education Program*, 1, pp. 1-20.

Caluwé, E., Halamová, K. e Damme, P.V. (2010). *Adansonia digitata* L. – A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika Focus*, 23(1), pp. 11-51.

Chadare, F. J. *et al.* (2009). Baobabb food products: a review on their composition and nutritional value. *Food Science and Nutrition*, 49, pp. 254-274.

Cheung, L.M., Cheung, P.C.K. e Ooi, V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 80(2), pp. 249-255.

Chevalier, A. (2000). *Natural Health Encyclopedia of Herbal Medicine*. 2ªEd. New York, Darling Kindersley Limited.

Chun, O. K. *et al.* (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruits and vegetables in the American diet. *Science Food Agriculture*, 85, pp. 1715-1724.

Compaoré, W. R. *et al.* (2011). Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biblobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*, 3(1), pp. 64-72.

Coppens, P., Da Silva, M. F. e Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology*, 221, 59-74.

Cseke, L. J. *et al.* (2006). *Natural Products from Plants Second Edition*. Taylor & Francis. London.

Danthu, P. *et al.* (1995). Baobabb (*Adansonia digitata* L.) seed pretreatments for germination improvement. *Seed Science and Technology*, 23(2), pp. 469–475.

Deng, G. F. *et al.* (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International Journal Molecular Science*, 13, pp. 8308-8323.

Dirar, H. A. (1993) Thei fermented foods of the Sudan: A Study in *African Food and Nutrition*. UK.

DosSantos, H. A. e Damon, M. (1996). *Manuel de Nutrition Africaine*. Dakar. Karthala Publishing Co.

Evans, W. C. (2002). *Pharmacognosy 15th ed.* Edinburgh. W.B.Saunders.

Fakeye, O.T., Adisa, R. e Musa, E.I. (2009). Attitude and use of herbal medicines among pregnant women in Nigeria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(53), pp. 1-7.

Fenner, M. (1980). Some measurements on the water relations of baobabb trees. *Biotropica*, 12 (3), pp.205-209.

Gebauer, J., El-Siddig, K. e Ebert, G. (2002). Baobabb (*Adansonia digitata* L.): a review on a multipurpose tree with promising future in the Sudan. *Gartenbauwissenschaft*, 67(4), pp. 155-160.

Genovese, M. I., *et al.* (2003). Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Ciências Farmacêuticas*, 39, pp. 167-169.

Glew, R.S. *et al.* (2005). Nutrient content of four edible wild plants from West Africa. *Plant Foods Human Nutrition*, 60, pp. 187-193.

Gruenwald, J. e Galizia, M. (2005). *Adansonia digitata* L. *Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species*. The United Nations Conference on Trade and Development.

Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L. e Katan, M.B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57, pp. 43-46.

Huang, D., Ou, B. e Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 1841-1856.

Ibiyemi, S. A., Abiodun, A. e Akanji, S. A. (1988). *Adansonia digitata*, Bombax and Parkia filicoideae Welw: Fruit pulp for the soft drink industry. *Food Chemistry*, 28, pp. 111-116.

Ighodalo, C.E., Catherine, O.E. e Daniel, M.K. (1991). Evaluation of mineral elements and ascorbic acid contents in fruits of some wild plants. *Plant Food Human Nutrition*, 41, pp. 151-154.

Javanmardi, J. e Kubota, C. (2006). Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41, pp. 151-155.

Kaur, C. e Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health internacional. *Journal of Food Science and Technology*, 36(7), pp. 703-725.

Khan, R.A., *et al.* (2012). Evalution of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal*, 6, pp.12-18.

Kitula, R.A. (2007). Use of medicinal plants for human heath in Udzungwa Mountains Forests: a case study of New Dabaga Ulongambi Forest Reserve, Tanzania. *Journal Ethnobiology Ethnomedicine*, pp. 3-7.

Lafuente, A.G. *et al.* (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammatory Research*, 58, pp. 537-552.

Lako, J. *et al.* (2007). Phytochemical flavonols, carotenóides and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruits, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101, pp. 1727-1741.

Lam, R. *et al.* (2007). Antioxidant actions of phenolic compounds found in dietary plants on low-density lipoprotein and erythrocytes *in vitro*. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(3), pp.233–242.

Lamien-Meda, A. *et al.* (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13(3), pp. 581-594.

Lajolo, F.M. (2005). Alimentos funcionais: uma visão geral. In: Angelis, R.C. *A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidade degenerativas*. São Paulo: Atheneu, p.175-181.

Leong, L.P. e Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, pp. 69-75.

Leung, W.T.W. (1968). *Food composition table for use in Africa*. Rome and Washington. FAO and US Department of Health, Education, and Welfare.

Masola, S. N., Mosha, R. D. e Wambura, P. N. (2009). Assessment of antimicrobial activity of crude extracts of stem and root barks from *Adansonia digitata* (African baobabb). *African Journal of Biotechnology*, 8(19), pp. 5076-5083.

Moraes, F.P. e Colla, L.M. (2006). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3 (2), pp. 109-122.

Naczki, M. e Shaidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054(1-2), pp 95-111.

Neergheen, V.S. *et al.* (2010). Phenolic constituents and antioxidant efficacies of some Mauritian traditional preparations commonly used against cardiovascular disease. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2(3), pp. 44-52.

Niki, E. (2002). Antioxidant activity: are we measuring it correctly? *Nutrition*, 18(6), pp. 524-525.

Nour, A.A., Magboul, B.I. e Kheri N.H. (1980). Chemical composition of baobabb fruit (*Adansonia digitata* L.). *Tropical Science*, 22(4), pp. 383-388.

Nhukarume, L.Z. *et al.* (2010). Phenolic content and antioxidant capacities of *Parinari curatelifolia*, *Strychnos spinosa* and *Adansonia digitata*. *Journal of Food Biochemistry*, 34, pp. 207-221.

Okpuzor, J. *et al.* (2008). The potential of medical plants in sickle cell disease control: A review. *Internacional Journal of Biomedical and Health Sciences*, 4(2), pp. 47-55.

Oloyede, G. K., *et al.* (2010). Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of four Nigerian medicinal plants. *Scholars Research Library*, 1(2), pp.114-120.

Olorumisola, O.S., Bradley, G. e Afolayan, A.J. (2012). Antioxidant activity of acetone and ethanolic leaves extracts of *Hippobromus pauciflorus* (L.f.) Radlk. *African Journal of Biotechnology*, 11(5), pp. 1206-1213.

Osman, M.A. (2004). Chemical and nutrient analysis of baobabb (*Adansonia digitata*). fruit and seed protein solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, pp. 29-33.

Patel, V.R., Patel, P.R. e Kajal, S.S. (2010). Antioxidant activity of some selected medicinal plants in western region of India. *Advances in Biological Research*, 4(1), pp.23-26.

Pénicaud, C. *et al.* (2010). Ascorbic acid in food: development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination. *Food Research Internacional*, 43, pp. 838-847.

- Pimentel, C.V. M. B., Francki, V. M. e Gollucke, A. P. B. (2005). *Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos*. Livraria Varela, p.95.
- Pregmolatto, W. e Pregmolatto, N. P. (1985). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*.
- Priscila, M. A. e Neuza, J. (2007). Phenolic compounds in foods. *Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1), pp. 1-9.
- Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Ramadan, F. M., Harraz, S. A, e El-Mougy. (1994). Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of the fruit pulp of *Adansonia digitata*. *Fitoterapia*, 65, pp. 418- 422.
- Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radical Biology Medicine*, 36, pp. 827-828
- Rodriguez, H.G. *et al.* (2003). Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. *Revista Nutrição*, 16(3), pp. 315-320.
- Rufino, M. S. , *et al.* (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, pp. 996-1002.
- Ryś, E. J, Korona, M.Z. e Kalbarczyk, J. (2009). Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(2), pp. 115-120.
- Saka, J. D. K., Msonthi, J. D. e Maghembe, J. A. (1994). Nutritional value of edible fruits of indigenous wild trees in Malawi. *Forest Ecology Management*, 64(2-3), pp. 245-248.

Seifried, H. E. *et al.* (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, pp. 567- 579.

Sidhu, K. e Pannu, K. (2010). Indigenous use of medicinal plants for health care. *Ethnopharmacology Medicine*, 4(2), pp.145-148.

Sidibe, M. e Williams, J.T. (2002) *Fruits for the Future 4 - Baobabb, Adansonia digitata L.* International Centre for Underutilised Crops, p. 96.

Silva, F.A.V., Borges, M.F.M. e Ferreira, M.A. (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 2(1), pp. 94-103.

Sofowora, A. (1993). *Medical plants and traditional medicine in Africa*. Ibadan, Spectrum Books.

Sousa, D. P. (2011). Analgesic- like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16, pp. 2233-2252.

Souza, P. H. M., Souza, N. M. H e Maia, G. A. (2003) Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*, 37(2), pp. 127-135.

Spiertz H. (2010). Food production, crops and sustainability: Restoring confidence in science and technology. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2, pp. 439-443.

Stahl, W. e Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, pp. 345-351.

Stahl, W. e Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), pp. 1-9.

- Sukanya, S. L. *et al.* (2009). Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 8(23), pp. 6677-6682.
- Sumner, J. (2000). *The natural History of medicinal Plants*. Portland, Timber Press.
- Tabart, J. *et al.* (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), pp. 1226-1233.
- Tapas, R., Sakarkar, D.M. e Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: areview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), pp. 1089-1099.
- Touré, A. e Xueming, X. (2010). Flaxseed Lignans: Source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Food Science and Food Safety*, 9(3), pp. 261–269.
- Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M. e Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*, 11, pp.133-153.
- Troconis-Torres, I.G. *et al.* (2012). Biochemical and molecular analysis of some commercial samples of chilli peppers from México. *Journal Biomedicine Biotechnology*, 2012, pp. 1-11.
- Van Boekel, M.A.J.S. e Jongen, W.M.F. (1997). Product quality and food processing: how to quantify the healthiness of a product. *Cancer Letters*, 114, pp. 65-69.
- Venter, F. e Venter, J. A. (1996). Marking the most of indigenous trees. *Briza Publications*, 10, pp. 127-136.
- Vertuani, S. *et al.* (2002). Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* fruit pulp and leaves. *Acta Phytotherapeutica*, 2, pp. 2-7.

Vimalanathan, S. e Hudson, J. B. (2009). Multiple inflammatory and antiviral activities in *Adansonia digitata* (baobabb) leaves, fruits and seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8), pp. 576-582.

Vinha, A. F. *et al.* (2012a). Chemical composition and antioxidant activity in Portuguese diospyrus kaki fruit by geographical origins. *Journal Agricultural Science*, 4 (2), pp. 281-289.

Vinha, A. F. *et al.* (2012b). Study of the influences by geographical origin in chemical characters, sugars, and antioxidant activity of Portuguese autochthonous *Prunus armeniaca* L. *Experimental Agriculture & Horticulture*, 1(1), pp. 8-20.

Vinha, A. F. (2005). Provas de Estudos Avançados (DEA). *Importância dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes*. Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo, Espanha.

Wickens, G.E. (1982). The baobabb – Africa's upside-down tree. *Kew Bulletin*, 37, pp. 173- 209.

Wickens, G.E. e Lowe, P. (2008). The Baobabbs: pachycauls of Africa, Madagascar and Australia. *Springer*.

Wilkinson, J. M. e Cavanagh, H. M. (2005). Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytotherapy Research*, 19(7), pp. 643-646.

Wilkinson, J. (2006). *Baobabb Dried Fruit Pulp - An application for Novel foods Approval in the EU as a food Ingredient*.

Williams, R.J., Spencer, J.P.E. e Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), pp. 838-849.

Zieliski, H. e Kozowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry, 48, pp. 2008-2016.